

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

29.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 3月31日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-096370

[ST. 10/C]: [JP2003-096370]

出 願 人
Applicant(s):

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社
第一製薬株式会社

REC'D 17 OCT 2003

WIPO

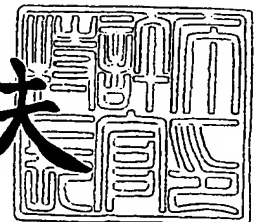
PCT

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP03-1020

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61P 3/10
C12N 09/50
C12Q 01/37

【発明の名称】 ヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

【請求項の数】 57

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区中瀬 1 丁目 3 番地
幕張テクノガーデン D 棟 1 7 階
セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社内

 【氏名】 土居 洋文

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西 1 丁目 1 6 番 1 3 号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内

 【氏名】 工藤 玄

【特許出願人】

 【識別番号】 500520628

 【氏名又は名称】 セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 000002831

 【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100088904

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 庄司 隆

 【電話番号】 03-3864-6572

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-254973

【出願日】 平成14年 8月30日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 067070

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヘパトサイトヌクレアーファクター4 α の分解方法、分解阻害方法および分解阻害剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カルシウムの存在下、カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を共存させることを特徴とするHNF-4 α の分解方法。

【請求項2】 カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-1 α の分解方法。

【請求項3】 カルシウムの存在下、m-カルパインおよび/または μ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を共存させることを特徴とするHNF-4 α の分解方法。

【請求項4】 カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) の分解阻害方法。

【請求項5】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の切断を阻害することを特徴とするHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項6】 カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の結合を阻害することを特徴とするHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項7】 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項8】 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α)

)を発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項9】 細胞が膵臓 β 細胞である請求項8に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項10】 細胞が哺乳動物に担持されている細胞である請求項8に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

の分解阻害方法。

【請求項11】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF-4 α を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である請求項7または8に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項12】 カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂ClまたはZ-Val-Phe-CHOである請求項11に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項13】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるHNF-4 α の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項7または8に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項14】 カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるHNF-4 α の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項7または8に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項15】 カルパインによるHNF-4 α の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものである請求項14に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項16】 カルパインがm-カルパインおよび/または μ -カルパインである請求項4から15のいずれか1項に記載のHNF-4 α の分解阻害方法。

【請求項 17】 カルパインを有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) 分解剤。

【請求項 18】 カルパインが m-カルパインおよび/または μ -カルパインである請求項 17 に記載の HNF-4 α 分解剤。

【請求項 19】 カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) 分解阻害剤。

【請求項 20】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の切断を阻害することを特徴とする HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 21】 カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の結合を阻害することを特徴とする HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 22】 カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) 分解阻害剤。

【請求項 23】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF-4 α を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる 1 つ以上の物質である請求項 22 に記載の HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 24】 カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂Cl または Z-Val-Phe-CHO である請求項 23 に記載の HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 25】 カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによる HNF-4 α の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項 22 に記載の HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 26】 カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列のうちの連続する 3 つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによる HNF-4 α の切断認識部位の少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むペプチドである請求項 22 に記載の HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 27】 カルパインによる HNF-4 α の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-Met および Val-Arg からなる群より選ばれるものである請求項 26 に記載の HNF-4 α 分解阻害剤。

【請求項 28】 カルパインが m-カルパインおよび/または μ -カルパインである請求項 19 から 27 のいずれか 1 項に記載の HNF-4 α の分解阻害剤。

【請求項 29】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解を阻害することを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項 30】 カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法。

【請求項 31】 m-カルパインおよび/または μ -カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解を阻害することを特徴とする HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法。

【請求項 32】 請求項 4 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項 33】 請求項 4 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項 34】 請求項 4 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および/または

治療方法。

【請求項 35】 請求項 4 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 36】 請求項 4 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 37】 請求項 4 から 16 のいずれか 1 項に記載の阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項 38】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項 39】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法。

【請求項 40】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 41】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 42】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。

【請求項 43】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法。

【請求項 44】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。

【請求項 45】 請求項 19 から 28 のいずれか 1 項に記載の阻害剤を含んでなる、インシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤。

【請求項46】 請求項19から28のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる医薬組成物。

【請求項47】 請求項19から28のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項48】 請求項19から28のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項49】 請求項19から28のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、インシュリンの減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

【請求項50】 請求項19から28のいずれか1項に記載の阻害剤を含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤。

【請求項51】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α)の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるHNF-4 α の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、カルパインによるHNF-4 α の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-4 α の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項52】 カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α)の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるHNF-4 α の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、HNF-4 α 量またはHNF-4 α 分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-4 α の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項53】 カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α)の結合

を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインとHNF-4 α の結合を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、カルパインとHNF-4 α の結合を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインとHNF-4 α の結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法。

【請求項54】 カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである請求項51から53のいずれか1項に記載の同定方法。

【請求項55】 請求項51から54のいずれか1項に記載の同定方法で同定された化合物。

【請求項56】 カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α)、HNF-4 α をコードするポリヌクレオチドおよびHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット。

【請求項57】 カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである請求項56に記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) (以下、HNF-4 α と略称する。)の分解および該分解の阻害に関する。より具体的にはカルパイン (calpain)、好ましくはm-カルパインまたは μ -カルパインによるHNF-4 α の分解方法および分解剤に関する。また、カルパイン、好ましくはm-カルパインまたは μ -カルパインによるHNF-4 α の分解阻害方法および分解阻害剤に関する。さらに、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法および産生促進剤に関する。ま

た、HNF-4 α の分解に起因する疾患、例えば糖尿病の防止方法および／または治療方法並びに防止剤および／または治療剤に関する。さらに、カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害する化合物の同定方法および該同定方法により同定された化合物に関する。また、カルパイン、HNF-4 α 、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】

カルパイン (EC 3.4.22.17) は、カルシウム依存性システインプロテアーゼであり、蛋白質を限定的に切断してその構造や機能を変化させる酵素である。カルパインには、構造的特徴、組織局在およびカルシウム要求性などによって分類される多くのアイソザイムが知られており、これらからなるスーパーファミリーを構成している。

【0003】

m-カルパインは、カルパインスーパーファミリーの1つであり、カルパイン2とも呼ばれ、多くの組織で発現している (非特許文献1)。m-カルパインは1 mM程度のカルシウム濃度で活性化され、酵素活性を発現する。

【0004】

μ -カルパインは、カルパイン1とも呼ばれ、m-カルパインと同様に多くの組織で発現している (非特許文献1および非特許文献2)。 μ -カルパインは、m-カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、数十 μ M程度のカルシウム濃度で活性化され、その酵素活性を発現する。

【0005】

m-カルパインおよび μ -カルパインにより分解される蛋白質としては、p53、レチノイドXレセプター (RXR) など多くの転写因子が報告されている (非特許文献3、非特許文献4および非特許文献5)。カルパインにより分解される蛋白質には、カルパインによって優先的に切断されるアミノ酸モチーフが存在する (非特許文献6)。例えば、ロイシン残基 (Leu) またはバリン残基 (Val) などの疎水性アミノ酸残基に続く、チロシン残基 (Tyr)、メチオニン

残基 (Me t) またはアルギニン残基 (A r g) とそれに続くアミノ酸残基との間で切断される。現在、いくつかのカルパイン阻害剤が市販されているが、このような切断モチーフを含むアミノ酸配列からなるペプチド N-A c e t y l-L e u-L e u-M e t-CH O が m-カルパインの競合阻害剤として知られている (非特許文献7) (CALBIOCHEM社)。また N-A c e t y l-L e u-L e u-N l e-CH O は、 μ -カルパインの競合阻害剤として知られている (非特許文献8) (CALBIOCHEM社)。その他、不可逆的なカルパイン阻害剤である Z-L e u-L e u-T y r-CH₂F (非特許文献9) や Mu-V a l-H P h-CH₂F (非特許文献10)、可逆的なカルパイン阻害剤である 4-フルオロフェニルスルホニル (F l u o r o p h e n y l s u l f o n y l)-V a l-L e u-CH O (非特許文献11)、および L e u-L e u-P r o-クロロメチルケトン (C h l o r o m e t h y l k e t o n e) (非特許文献12) などが市販されている (CALBIOCHEM社)。

【0006】

カルパインは細胞機能の調節に関与しているため、カルパインの活性制御の不全やその遺伝子の欠損などにより種々の疾患が引き起こされる。例えば、いくつかの糖尿病モデル動物では組織のカルパイン活性が亢進している (非特許文献13 および 非特許文献14)。カルパイン阻害剤により膵島におけるグルコースに対するインシュリン分泌応答が増強されたことから、インシュリンの分泌と作用の調節へのカルパインの関与が示唆されている (非特許文献15)。また、カルパイン10遺伝子の変異と2型糖尿病罹患率との間の関連性が指摘されている (非特許文献16 および 非特許文献17)。

【0007】

一方、m-カルパインおよび μ -カルパインは、外傷性脳損傷、アルツハイマー病、脳卒中および白内障に関与していることが示唆されている (非特許文献2)。

【0008】

以下に、本明細書で引用した文献を列記する。

【非特許文献1】反町洋之、「生化学」2000年、第72巻、第11号、p.

1297-1315。

【非特許文献2】Huang, Y. et al., 「TRENDS in Molecular Medicine」2001年, 第7巻, p. 355-362。

【非特許文献3】Matsushima-Nishiwaki, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」1996年, 第225巻, p. 946-951。

【非特許文献4】Pariat, M., et al., 「Molecular and Cellular Biology」1997年, 第17巻, p. 2806-2815。

【非特許文献5】Watt F. et al., 「Nucleic Acids Research」1993年, 第21巻, p. 5092-5100。

【非特許文献6】Sasaki, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」1984年, 第259巻, p. 12489-12494。

【非特許文献7】Ravid, T. et al., 「Journal of Biological Chemistry」2000年, 第275巻, p. 35840-。

【非特許文献8】Debiasi, R. L. et al., 「Journal of Virology」1999年, 第73巻, p. 659-。

【非特許文献9】Dutt, P. et al., 「FEBS Letter」1998年, 第436巻, p. 367-。

【非特許文献10】Esser, R. E. et al., 「Arthritis and Rheumatism」1994年, 第37巻, p. 236-。

【非特許文献11】Nath, R. et al., 「Biochemical and Biophysical Research Communications」2000年, 第274巻, p. 16-。

【非特許文献12】Sasaki, T. et al., 「Journal of

Biochemistry」1986年, 第99巻, p. 173-。

【非特許文献13】Brooks, B. A. et al., 「American Journal of Physiology」1983年, 第244巻, 第3号, p. C175-181。

【非特許文献14】Kobayashi, S. et al., 「Endocrinologia Japonica」1989年, 第36巻, 第6号, p. 833-844。

【非特許文献15】Sreeman, S. K. et al., 「Diabetes」2001年, 第50巻, p. 2013-2020。

【非特許文献16】Horikawa, Y. et al., 「Nature Genetics」2000年, 第26巻, p. 163-175。

【非特許文献17】Baier, L. J. et al., 「Journal of Clinical Investigation」2000年, 第106巻, p. R69-73。

【非特許文献18】Shih, D. Q. et al., 「Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America」2001年, 第98巻, p. 14189-14191。

【非特許文献19】「BIO Clinica」2002年, 第17巻, p. 410-414。

【非特許文献20】Stoffel, M. et al., 「Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America」1997年, 第94巻, p. 13209-13214。

【非特許文献21】Shih, D. Q. et al., 「Diabetes」2001年, 第50巻, p. 2472-2480。

【非特許文献22】Ban, N. et al., 「Diabetes」2002年, 第51巻, p. 1409-1418。

【非特許文献23】Cah, J. Y. et al., 「Experimenta

l and Molecular Medicine] 2001年, 第33巻, 第2号, p. 59-63。

【非特許文献24】Bartholomew-Shifman, R. et al., 「Journal of Biological Chemistry」2002年, 第277巻, 第29号, p. 25914-25919。

【非特許文献25】Ryffel, G. U. et al., 「Journal of Molecular Endocrinology」2001年, 第27巻, p. 11-29。

【非特許文献26】「臨床病理」2001年、第49巻、第2号、p. 161-164。

【非特許文献27】Gragnoli, C. et al., 「Diabetes」1997年, 第46巻, p. 1648-1651。

【非特許文献28】Sladek, F. M. et al., 「In Nuclear Receptors and Genetic Disease」2001年, p. 309-361 Eds. TB Burris & ERB McCabe, San Diego; Academic Press。

【非特許文献29】Marlene, J. R. et al., 「Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America」1992年, 第89巻, p. 6300-6303。

【非特許文献30】Carew, J. A. et al., 「BLOOD」2000年, 第15巻, p. 4370-4372。

【非特許文献31】Ulmer, K. M. 「Science」1983年, 第219巻, p. 666-671。

【非特許文献32】「ペプチド合成」(日本国)、丸善株式会社、1975年。

【非特許文献33】「ペプチド合成 (Peptide Synthesis)」(米国)、インターサイエンス、1996年。

【非特許文献34】Bjorklund, A. et al., 「Diabetes」2000年, 第49巻, p. 1840-1848。

【非特許文献35】Maruyama, K. et al., 「International Journal of Molecular Medicine」2000年, 第5巻, p. 269-273。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、カルパインと相互作用する蛋白質を見出し、カルパインによる当該蛋白質の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供しようとするものである。

【0010】

【課題解決のための手段】

上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、m-カルパインがHNF-4 α と相互作用することをインシリコ (in silico) で予測し、さらに実験的に、該相互作用の結果、m-カルパインがHNF-4 α に結合してこれを分解することを明らかにした。また、m-カルパインと同じくカルパインスーパーファミリーに属する μ -カルパインがHNF-4 α を分解することを見出した。そして、これら知見に基づき本発明を完成した。

【0011】

すなわち本発明は、

1. カルシウムの存在下、カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を共存させることを特徴とするHNF-4 α の分解方法、
2. カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解程度を変えることを特徴とする、HNF-4 α の分解方法、
3. カルシウムの存在下、m-カルパインおよび／または μ -カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を共存させることを特徴とするHNF-4 α の分解方法、
4. カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファク

ター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) の分解阻害方法、

5. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の切断を阻害することを特徴とするHNF-4 α の分解阻害方法、

6. カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の結合を阻害することを特徴とするHNF-4 α の分解阻害方法、

7. 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を含む生体外試料をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-4 α の分解阻害方法、

8. 少なくともカルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) を発現している細胞をカルパイン活性を阻害する物質で処理することを特徴とする、HNF-4 α の分解阻害方法、

9. 細胞が膵臓 β 細胞である前記8. のHNF-4 α の分解阻害方法、

10. 細胞が哺乳動物に担持されていることを特徴とする細胞である前記8. のHNF-4 α の分解阻害方法、

の分解阻害方法、

11. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF-4 α を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記7. または8. のHNF-4 α の分解阻害方法、

12. カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂ClまたはZ-Val-Phe-CHOである前記11. のHNF-4 α の分解阻害方法、

13. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるHNF-4 α の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記7. または8. のHNF-4 α の分解阻害方法、

14. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるHNF-4 α の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記7. または8. のHNF-4 α の分解阻害方法、

15. カルパインによるHNF-4 α の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものである前記14. のHNF-4 α の分解阻害方法、

16. カルパインがm-カルパインおよび/または μ -カルパインである前記4. から15. のいずれかのHNF-4 α の分解阻害方法、

17. カルパインを有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) 分解剤、

18. カルパインがm-カルパインおよび/または μ -カルパインである前記17. のHNF-4 α 分解剤、

19. カルパイン活性を阻害することを特徴とするヘパトサイトヌクレアーファクター-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) 分解阻害剤、

20. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の切断を阻害することを特徴とするHNF-4 α 分解阻害剤、

21. カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター-4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の結合を阻害することを特徴とするHNF-4 α 分解阻害剤、

22. カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなるヘパトサイトヌクレアーファクター-4 α (hepatocyte nuclear fact

or 4α ; HNF- 4α) 分解阻害剤、

23. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインを認識する抗体、HNF- 4α を認識する抗体およびカルパインインヒビターから選ばれる1つ以上の物質である前記22. のHNF- 4α 分解阻害剤、

24. カルパインインヒビターが、N-Acetyl-Leu-Leu-Met-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂ClまたはZ-Val-Phe-CHOである前記23. のHNF- 4α 分解阻害剤、

25. カルパイン活性を阻害する物質が、カルパインによるHNF- 4α の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記22. のHNF- 4α 分解阻害剤、

26. カルパイン活性を阻害する物質が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり且つカルパインによるHNF- 4α の切断認識部位の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである前記22. のHNF- 4α 分解阻害剤、

27. カルパインによるHNF- 4α の切断認識部位が、Leu-Tyr、Leu-Met、Leu-Arg、Val-Tyr、Val-MetおよびVal-Argからなる群より選ばれるものである前記26. のHNF- 4α 分解阻害剤、

28. カルパインがm-カルパインおよび/または μ -カルパインである前記19. から27. のいずれかのHNF- 4α の分解阻害剤、

29. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター 4α (hepatocyte nuclear factor 4α ; HNF- 4α) の分解を阻害することを特徴とする、HNF- 4α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

30. カルシウム濃度によりヘパトサイトヌクレアーファクター 4α (hepatocyte nuclear factor 4α ; HNF- 4α) の分解程

度を変えることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法、

31. m-カルパインおよび／または μ -カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解を阻害することを特徴とするHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法、

32. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

33. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

34. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

35. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

36. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

37. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

38. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

39. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、インシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進方法、

40. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

41. 前記4. から16. のいずれかの阻害方法を用いることを特徴とする、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

42. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、イ

ンシュリンの減少に起因する疾患の防止方法および／または治療方法、

43. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を用いることを特徴とする、糖尿病の防止方法および／または治療方法、

44. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、

45. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる、インシュリン遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤、

46. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる医薬組成物、

47. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

48. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

49. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる、インシュリンの減少に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、

50. 前記19. から28. のいずれかの阻害剤を含んでなる、糖尿病の防止剤および／または治療剤、

51. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるHNF-4 α の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、カルパインによるHNF-4 α の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-4 α の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、

52. カルパインによるヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の分解を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインによるHNF-4 α の切断を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、

HNF-4 α 量またはHNF-4 α 分解物量を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインによるHNF-4 α の切断を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、

53. カルパインとヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α) の結合を阻害する化合物の同定方法であって、カルパインとHNF-4 α の結合を可能にする条件下、カルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、カルパインとHNF-4 α の結合を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用い、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、被検化合物がカルパインとHNF-4 α の結合を阻害するか否かを決定することを含む同定方法、

54. カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである前記51. から53. のいずれかの同定方法、

55. 前記51. から54. のいずれかの同定方法で同定された化合物、

56. カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチドおよびカルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、ヘパトサイトヌクレアーファクター4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α ; HNF-4 α)、HNF-4 α をコードするポリヌクレオチドおよびHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つを含んでなる試薬キット、

57. カルパインが、m-カルパインまたは μ -カルパインである前記56. の試薬キット、
からなる。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明においては、m-カルパインとHNF-4 α が相互作用することを国際公開WO01/67299号公報記載の方法に従ってインシリコ (in silico) で予測した。さらに実験的に、m-カルパインがHNF-4 α と結合す

ること、および m -カルパインがHNF-4 α を分解することを初めて明らかにした。また、 m -カルパインと同じくカルパインスーパーファミリーに属する μ -カルパインが同様にHNF-4 α を分解することを見出した。 m -カルパインがHNF-4 α と結合してこれを分解すること、および μ -カルパインがHNF-4 α を分解することから、 μ -カルパインもHNF-4 α に結合すると考えられる。

【0013】

HNF-4 α （配列番号1）は m -カルパインまたは μ -カルパインにより、下記切断部位で切断されると考えられる（図1）：アミノ酸配列第79番目のバリリン（V）に続くアルギニン（R）とそれに続くリジン（K）との間；第211番目のロイシン（L）に続くアルギニン（R）とそれに続くアラニン（A）との間；第302番目のロイシン（L）に続くアルギニン（R）とそれに続くセリン（S）との間；および第384番目のロイシン（L）に続くメチオニン（M）とそれに続くグルタミン（Q）との間。

【0014】

本明細書においてはアミノ酸を1文字表記または3文字表記することがある。また、ペプチドとは、ペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個またはそれ以上のアミノ酸を含む任意のペプチドを意味し、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称する短鎖ペプチド、並びにポリヌクレオチドや蛋白質などの長鎖ペプチドを包含する。

【0015】

HNF-4 α は核内レセプターであり、肝臓、腎臓、小腸、および膵臓の β 細胞で発現している。HNF-4 α は転写因子として作用し、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。例えば、膵臓の β 細胞においてヘパトサイトヌクレアーファクター1 α （HNF-1 α ）やインシュリンプロモーターファクター1（IPF-1/PDX-1）などと転写因子ネットワークを形成すると考えられている。特にHNF-1 α のポジティブレギュレーター（positive regulator）として機能し、インシュリン、グルコーストランスポーター2（GLUT2）、およびグルコキ

ナーゼ (Glucokinase) などの糖代謝関連遺伝子の発現を制御する (非特許文献18、非特許文献19、非特許文献20、非特許文献21、非特許文献22および非特許文献23)。従来、HNF-4 α のインシュリン遺伝子発現に対する作用は、HNF-1 α レベルの上昇を介した間接的なものであると考えられてきた。しかし、HNF-4 α が、インシュリン遺伝子プロモーター内で新規に見出されたシスエレメント (cis element) に結合し、直接的にその発現を調節することが報告された (非特許文献24)。

【0016】

HNF-4 α 遺伝子は、遺伝性2型糖尿病MODY1 (Maturity-onset diabetes of the young 1) の原因遺伝子であることが明らかにされている (非特許文献25および非特許文献26)。さらに、プロモーターのHNF-4 α 結合部位に自然変異を有するヒト遺伝子が、今までに複数同定されている。

【0017】

HNF-4 α の結合部位に変位を誘導する変位体が見出されている遺伝子の1つは、上述のHNF-1 α をコードする遺伝子である。HNF-1 α プロモーターにおけるHNF-4 α 結合部位の変異によりHNF-4 α がプロモーターに結合せず、その結果HNF-1 α の発現が低減し、遺伝性2型糖尿病MODY3が惹起される (非特許文献27)。

【0018】

かかる遺伝子としてはその他に、血液凝固に関与する因子である第VII因子および第IX因子をそれぞれコードする遺伝子が挙げられる。第IX因子遺伝子のプロモーターにおけるHNF-4 α 結合部位の変異は、血友病の原因となる (非特許文献28および非特許文献29)。また、第VII因子遺伝子のプロモーターにおけるHNF-4 α 結合部位の変異が、重症第VII因子欠損症 (severe factor VII deficiency) の患者で認められている (非特許文献30)。

【0019】

これらから、HNF-4 α の減少や機能欠損は、HNF-4 α が転写因子とし

て作用する遺伝子の発現を低減させ、その結果、当該遺伝子の遺伝子産物の産生を低下させると考えられる。すなわち、HNF-4 α の減少や機能欠損は、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する生体機能の異常を引き起こし、さらには、当該遺伝子産物の減少に起因する疾患の原因になると推察される。例えばHNF-4 α の減少や機能欠損により、膵臓の β 細胞において転写因子ネットワークが破綻し、糖代謝の異常が引き起こされると考えられる。HNF-4 α の減少や機能欠損の原因の1つとしては、例えばHNF-4 α の分解が挙げられる。

【0020】

したがって、HNF-4 α の分解を阻害することにより、HNF-4 α の機能、例えば転写因子としての機能を促進することが可能である。さらに、HNF-4 α の分解を阻害することにより、HNF-4 α の減少や機能欠損に起因する疾患、あるいはHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。

【0021】

上記知見に基づいて達成した本発明において、カルパインはカルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼを全て包含するものである。カルパインスーパーファミリーに属するプロテアーゼとしては、m-カルパイン、 μ -カルパイン、カルパイン3、カルパイン5、カルパイン8、カルパイン9、カルパイン10、カルパイン11、カルパイン12およびカルパイン13などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくはm-カルパインまたは μ -カルパインである。 μ -カルパインはm-カルパインと比較してカルシウム要求性が低く、より低濃度のカルシウムにより活性化される。そのため、 μ -カルパインはm-カルパインと比較してカルシウム濃度上昇により活性化され易く、生体内で主に作用している可能性が考えられることから、より好ましくは μ -カルパインである。これら各プロテアーゼを使用するときは、これらを単独で用いてもよいし、2つ以上を組合せて用いることもできる。

またカルパインは、HNF-4 α のみを特異的に分解するものに限らず、複数の蛋白質、例えば複数の転写因子の分解に関与するものであってもよい。

【0022】

本発明においては、HNF-4 α の分解剤および分解方法を提供する。当該HNF-4 α の分解剤は、カルパインを有効成分として含んでなる。また、当該HNF-4 α の分解方法はカルパインとHNF-4 α を共存させることを特徴とする。カルパインはカルシウム依存性プロテアーゼであるため、該共存はカルシウム存在下で行なうことが好ましい。カルシウム濃度は、カルパインのカルシウム要求性を考慮し、カルパインを活性化してそれらの酵素活性を誘発できる濃度を用いる。例えば、m-カルパインを活性化するためには、好ましくは約1 mM以上のカルシウム濃度が好適である。 μ -カルパインを活性化するためには、好ましくは約10 μ M以上、より好ましくは約20 μ M以上、さらに好ましくは約30 μ M以上のカルシウム濃度が好適である。また、カルパインによるHNF-4 α の分解にはカルシウム濃度依存性があるため、カルシウム濃度を調節することによりカルパインによるHNF-4 α の分解程度を所望の程度に調節することができる。かかるカルシウム濃度の調節を特徴とするHNF-4 α の分解方法も本発明の範囲に包含される。また、カルパインとHNF-4 α を少なくとも含んでなり、カルパインとHNF-4 α を共存させることを特徴とするHNF-4 α の分解系を構築することが可能である。

【0023】

本発明に係るHNF-4 α の分解方法および分解系は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパインとHNF-4 α を、例えば試験管内やマルチウエルプレート内で、カルシウムの存在下で共存させて、HNF-4 α を分解させる分解方法および分解系が例示できる。あるいは、カルパインとHNF-4 α を共発現させた細胞を用いた分解方法および分解系を例示できる。発現に用いる細胞は、蛋白質の発現のために一般的に使用されている細胞を使用可能である。これら蛋白質の発現は、公知の遺伝子工学的手法を用いて実現することができる。かかる細胞を用いた分解方法および分解系において、細胞内カルシウム濃度を調節する、例えばカルパインが活性化する濃度に調節するためには、イオノフォアの使用が好適である。イオノフォアは、A23187など公知のものを用いることができる。また、非ヒト動物にカルパイン、さ

らにHNF-4 α の各遺伝子を自体公知の遺伝子工学的手法を用いて導入することにより、非ヒト動物におけるHNF-4 α の分解方法および分解系を提供することが可能である。

【0024】

本発明において使用するカルpainおよびHNF-4 α は、これらを遺伝子工学的手法で発現させた細胞、無細胞系合成産物、化学合成産物、または該細胞や生体試料から調製したものであってよく、これらからさらに精製されたものであってもよい。また、これら蛋白質は、それらのN末端側やC末端側に別の蛋白質やペプチドなどを、直接的にまたはリンカーペプチドなどを介して間接的に、遺伝子工学的手法などを用いて付加することにより標識化したものであってもよい。好ましくは、カルpainとHNF-4 α の相互作用およびこれら蛋白質の機能、例えばカルpainとHNF-4 α の接触、カルpainの酵素活性およびHNF-4 α の転写因子機能などが阻害されないような標識化が望ましい。付加する蛋白質やペプチドなどとしては、例えばグルタチオン S-トランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、免疫グロブリンのFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tagまたはExpress-tag、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ビオチン、グリーン蛍光蛋白質、フルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)、フィコエリスリン (phycoerythrin)、あるいは放射性同位元素などが挙げられるが、これらに限定されない。標識化するとき、これら蛋白質やペプチドなどは単独で付加してもよいし複数を組合わせて付加することもできる。これら標識化に用いた蛋白質またはペプチドなどの物質自体、またはその機能を測定することにより、HNF-4 α の分解を検出することが可能である。また、遺伝子導入に用いるカルpainおよびHNF-4 α の各遺伝子は、ヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製することができる。これら遺伝子を適当な発現ベクターDNA、例えば細菌プラスミド由来のベクターなどに自体公知の遺伝子工学的手法で導入し、上記各遺伝子を含有するベクターを得て、遺伝子導入に利用することができる。遺伝子導入は、自体公知の遺伝子工学的手法を用いて実

施可能である。

【0025】

上記 HNF-4 α の分解剤、分解方法および分解系は、HNF-4 α の機能解明や HNF-4 α が関与する転写因子ネットワークについての研究、および HNF-4 α の分解に起因する疾患、例えば糖尿病における HNF-4 α やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。また、当該分解方法および分解系を用いて、HNF-4 α の分解を阻害する化合物の同定方法を構築することも可能である。

【0026】

本発明はまた、HNF-4 α 分解の阻害剤および阻害方法を提供する。該阻害剤および阻害方法は、カルパイン活性を阻害すること、またはカルパインによる HNF-4 α の切断を阻害すること、あるいはカルパインと HNF-4 α の結合を阻害することを特徴とする。カルパイン活性の阻害またはカルパインによる HNF-4 α 切断の阻害は例えば、カルパインの酵素活性を阻害することにより、またはカルパインと HNF-4 α の結合を阻害することにより実施できる。

【0027】

HNF-4 α 分解の阻害剤および阻害方法はまた、カルパイン活性を阻害する物質を用いて達成することができる。本発明の範囲には、カルパイン活性を阻害する物質を有効成分として含んでなる HNF-4 α 分解の阻害剤、およびカルパイン活性を阻害する物質を用いることを特徴とする HNF-4 α 分解の阻害方法が含まれる。カルパイン活性を阻害する物質により処理される対象物としては、少なくともカルパインと HNF-4 α を含む対象物、例えば少なくともこれらを含む生体外試料が挙げられる。また、少なくともカルパインと HNF-4 α を発現している細胞、例えば膵臓 β 細胞など、およびかかる細胞を担持している哺乳動物なども当該対象物に含まれる。

【0028】

カルパイン活性を阻害する効果を有する物質の例としては、拮抗阻害効果を有するペプチド類、抗体および低分子化合物などが挙げられる。具体的には、カルパインインヒビターとして知られている N-Acetyl-Leu-Leu-M

e t-CHO、N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO、Z-Leu-Leu-Tyr-CH₂F、Mu-Val-HPh-CH₂F、4-フルオロフェニルスルホニル (Fluorophenylsulfonyl)-Val-Leu-CHO、Leu-Leu-Phe-CH₂ClまたはZ-Val-Phe-CHOなどが例示できる。抗体としては、カルパインまたはHNF-4 α を認識する抗体であって、カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害する抗体が挙げられる。HNF-4 α を認識する抗体は、さらに好ましくはHNF-4 α の機能、例えば転写因子活性を阻害しないものが好適である。かかる抗体は、カルパインまたはHNF-4 α 自体、またはこれらが相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により得ることができる。低分子化合物としては、カルパインの酵素活性を阻害する化合物、好ましくは該酵素活性を特異的に阻害する化合物が挙げられる。かかる化合物は、例えば、本発明に係る分解方法または分解系を利用して、カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害するものを同定することにより得ることができる。カルパインを特異的に阻害するとは、カルパインを強く阻害するが、他の酵素は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。

【0029】

また、カルパインによるHNF-4 α 分解の阻害は、例えば両蛋白質が相互作用する部位のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて実施可能である。かかるペプチドとして、HNF-4 α のアミノ酸配列（配列番号1）においてカルパインにより切断される部位、すなわち切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチドが例示できる。例えば、m-カルパインまたは μ -カルパインの切断認識部位のアミノ酸配列は、LY、LM、LR、VY、VMまたはVRであると考えられる。このような切断認識部位のアミノ酸配列を少なくとも1つ含むペプチドが好ましい。かかるペプチドは、カルパインによるHNF-4 α 分解を競合的に阻害すると考えられる。より好ましくは、HNF-4 α のアミノ酸配列（配列番号1）のうちの連続する3つ以上のアミノ酸残基からなり、且つカルパインの切断認識部位のアミノ酸配列を含むペプチドが挙げられる。

【0030】

また、カルパインとHNF-4 α の結合部位のアミノ酸配列からなるペプチドを例示できる。特に、m-カルパインの基質となるHNF-4 α 由来のかかるペプチド、例えばペプチドYKLLPG（配列番号4）（実施例1および図2を参照）または該ペプチドを含むペプチドは、両蛋白質の相互作用を競合的に阻害すると考えられる。

【0031】

上記ペプチドはさらに、酵素とペプチドの結合を安定化し、ペプチドが酵素から解離し難くするために通常よく使用される修飾、例えばC末端のアルデヒド化またはN末端のアセチル化などの修飾を施こしたものであってもよい。

【0032】

これらペプチドは、カルパインまたはHNF-4 α のアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、カルパインによるHNF-4 α の分解および／または結合を阻害するものを選択することにより得ることができる。

【0033】

このように特定されたペプチドに、1個乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したペプチドは、さらにカルパインによるHNF-4 α の切断を阻害するものが好ましい。変異を有するペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入などの変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマー（Ulmer）の技術（非特許文献31）を利用できる。このような変異の導入において、当該ペプチドの基本的な性質（物性、機能または免疫学的活性など）を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸（極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸など）の間での相互置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基などを、例えばアミド化修飾するなど、機能の著しい変更を伴わない程度に改変が可能である。

【0034】

上記ペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。例えば、公知文献に記載の方法（非特許文献32および非特許文献33）が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用可能である。

【0035】

本発明においてはまた、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生調節方法を提供可能である。産生調節方法の1つとしては、カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害することを特徴とする該遺伝子産物の産生促進方法が挙げられる。具体的には、該産生促進方法は、上記HNF-4 α 分解阻害剤またはHNF-4 α 分解阻害方法を使用することにより達成できる。また、上記HNF-4 α 分解阻害剤を含んでなる、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進剤も本発明の範囲に包含される。産生調節方法の別の1つとしては、カルシウム濃度を調節してHNF-4 α の分解程度を所望の程度に調節することにより、当該遺伝子産物の産生を調節する方法が挙げられる。カルシウム濃度を高濃度にしてカルパインを活性化させることによりHNF-4 α を分解することができるため、当該遺伝子産物の産生を低下させることができる。カルシウム濃度を低濃度にしてカルパインの酵素活性を減弱させることにより、HNF-4 α の分解を阻害することができるため、当該遺伝子産物の産生を促進することができる。HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物としては、HNF-4 α の結合部位をプロモーターまたはエンハンサー内に有する遺伝子の遺伝子産物が挙げられる。具体的には、インシュリン遺伝子、HNF-1 α 遺伝子、血液凝固第VII因子遺伝子、および血液凝固第IX因子遺伝子などの遺伝子産物が例示できる。

【0036】

さらに本発明においては、HNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法を提供する。本発明に係るHNF-4 α の分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤は、上記HNF-4 α 分解阻害剤を含んでなる。本発明に係るHNF-4 α の分解に起因する疾患の防止方法および／または治療方法は、上記HNF-4 α 分解阻害剤またはHNF-4 α 分解阻害方法を使用することにより達成できる。H

NF- κ B の分解に起因する疾患としては、例えば NF- κ B が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患が挙げられる。このような疾患として具体的には、糖代謝関連因子の減少に起因する疾患、例えばインシュリンの減少に起因する疾患などが例示できる。より具体的には、糖代謝異常による疾患、例えば糖尿病などが挙げられる。あるいは、血液凝固第 VII 因子または第 IX 因子の欠乏に起因する出血性疾患、例えば血友病や重症第 VII 因子欠損症などが例示できる。実際、マウスの膵臓ランゲルハンス島にカルパイン阻害剤を暴露させるとグルコース刺激によるインシュリン分泌が増加することが報告されている（非特許文献 15）。しかし、この報告においては、カルパインと NF- κ B の関連については開示されていない。また、膵島においては、高血糖状態が持続すると細胞内カルシウム濃度が上昇し、グルコース刺激性インシュリン分泌の脱感作が起こる（非特許文献 34）。本発明における知見から、長期の高血糖による細胞内カルシウム濃度の上昇によりカルパインが活性化され、その結果 NF- κ B が分解されるために、膵臓 β 細胞での転写因子ネットワークが破綻して糖代謝の異常が起き、ひいては 2 型糖尿病と同様の病態が誘発されるというカスケードが存在すると考えられる。したがって本発明によれば、上記カスケードにおいてカルパインによる NF- κ B の分解を阻害できるため、糖代謝の正常化を図り、糖代謝関連因子の減少に起因する疾患、例えば糖尿病を防止および／または治療可能である。

【0037】

本発明においてはまた、カルパインによる NF- κ B の分解を阻害する化合物の同定方法を提供する。該同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して構築可能である。また、本発明に係る分解系または分解方法を利用して、該同定方法を実施可能である。被検化合物としては、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、またはカルパインおよび NF- κ B の一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物などが挙げられる。あるいは、NF- κ B のカルパインによる切断認識部位のペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物なども被検化合物として好適である。

。

【0038】

具体的には、カルパインによる HNF-4 α の切断を可能にする条件を選択し、当該条件下でカルパインおよび／または HNF-4 α と被検化合物を接触させ、HNF-4 α の分解を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、カルパインによる HNF-4 α の分解を阻害する化合物を同定できる。カルパインによる HNF-4 α の切断を可能にする条件としては、例えばこれらカルパインを活性化する濃度のカルシウムの存在下であることが挙げられる。また、該条件はインビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、カルパイン HNF-4 α を共発現させた細胞を用いることもできる。カルパインおよび／または HNF-4 α と被検化合物の接触は、カルパインによる HNF-4 α の分解反応の前に行なってもよいし、当該反応に共存させることにより行なってもよい。ここでシグナルとは、そのものの自体がその物理的または化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとしてはルシフェラーゼ、グリーン蛍光蛋白質、および放射性同位体など、マーカーとしては、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子など、または検出用のエピトープタグ、例えば 6 \times His-tag など、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーは、単独で使用してもよく、2つ以上を組合わせて用いてもよい。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知のものである。簡便には、HNF-4 α の分解は、HNF-4 α 量または HNF-4 α 分解物量の存在若しくは不存在および／または変化の測定により検出できる。HNF-4 α 量または HNF-4 α 分解物量の定量は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法などを用いて実施できる。あるいは、HNF-4 α の分解の検出は、HNF-4 α の転写因子活性の存在若しくは不存在および／または変化の測定により行なうことができる。具体的には、例えば、HNF-4 α とカルパインを発現している細胞に、インシュリン遺伝子のプロモーター領域をその上流に組み込んだレポーター遺伝子を含むプラスミドをトランスフェク

とし、被検化合物とこの細胞を接触させた場合のレポーター遺伝子の発現量を、当該被検化合物と接触させなかった場合のレポーター遺伝子の発現量と比較することにより行なうことができる。

【0039】

その他、カルパインとHNF-4 α の結合を可能にする条件を選択し、当該条件下でカルパインおよび／またはHNF-4 α と被検化合物を接触させ、カルパインとHNF-4 α の結合を検出するシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、カルパインによるHNF-4 α の分解を阻害する化合物を同定できる。カルパインとHNF-4 α の結合の検出は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法などを用いて実施できる。

【0040】

上記同定方法で得られた化合物は、上記ペプチドと同様にHNF-4 α の分解阻害剤として利用可能である。上記ペプチドおよび／または上記化合物を含む阻害剤は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製可能である。医薬組成物の調製において、これらペプチドおよび／または化合物は、単独で使用することもできるし、複数を組み合わせて使用することも可能である。

【0041】

本発明に係るHNF-4 α 分解阻害剤、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤、並びにHNF-4 α の分解に起因する疾患、例えばHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはインシュリンなどの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止剤および／または治療剤の処方は、適当な医薬担体と組合わせて処方することが好ましい。かかる処方は、治療上有効量の上記ペプチド、抗体、化合物、HNF-4 α 分解阻害剤、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤、並びにHNF-4 α の分解に起因す

る疾患、例えばHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはインシュリンなどの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止剤および／または治療剤に、さらに医薬上許容される担体または賦形剤を含む。かかる担体としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限らない。処方は投与経路に適したものを選択すればよく、該処方当業者によく知られている。また、処方するときには、これらを単独で使用してもよく、あるいは治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。

【0042】

投与形態は、全身投与であっても局所投与であってもよい。全身投与の好ましい一態様は、注射、例えば静脈注射が挙げられる。皮下、筋肉内または腹腔内のような他の注射経路を用いることもできる。投与の別の態様は、腸溶処方またはカプセル処方がうまく処方されるならば、経口投与も可能である。さらに、胆汁酸塩またはフシジン酸または他の界面活性剤のような浸透剤を用いる経粘膜投与若しくは経皮投与を用いることもできる。局所的な投与においては、膏薬、パスタ、ゲルなどの形態での投与であってもよい。

【0043】

必要な用量範囲は、上記ペプチド、抗体、化合物、HNF-4 α 分解阻害剤、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物、例えばインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進剤、並びにHNF-4 α の分解に起因する疾患、例えばHNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患、具体的にはインシュリンなどの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止剤および／または治療剤の有効性、投与経路、処方の性質、対象の症状の性質、および担当医師の判断による。具体的には、適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり0.1 μ g乃至100 μ gの範囲である。しかしながら、当該分野においてよく知られた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量の変更を行うことができる。

【0044】

製剤化にあたっては、例えばペプチド、蛋白質、オリゴヌクレオチド、抗体、化合物など各対象の物性に応じた公知の製剤化手段を導入すればよい。具体的には、例えば散剤、丸剤、錠剤、カプセル製剤、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、リポソーム製剤、脂肪乳剤、シクロデキストリンなどの包接体などの製剤化方法が利用できる。

【0045】

散剤、丸剤、カプセル剤および錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトールなどの賦形剤、澱粉、アルギン酸ソーダなどの崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤、グリセリンなどの可塑剤などを用いて製造できる。錠剤やカプセルを製造するには、固体の製薬担体が用いられる。

【0046】

懸濁剤は、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトースなどの糖類、PEGなどのグリコール類、油類を使用して製造できる。

【0047】

注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、または塩水とグルコース溶液の混合物からなる担体を用いて調製可能である。

【0048】

リポソーム化は、例えばリン脂質を有機溶媒（クロロホルムなど）に溶解した溶液に、当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液を加えた後、溶媒を留去し、これにリン酸緩衝液を加え、振とう、超音波処理および遠心処理した後、上清をろ過処理して回収することにより行い得る。

【0049】

脂肪乳剤化は、例えば当該物質、油成分（大豆油、ゴマ油、オリーブ油などの植物油、MCTなど）、乳化剤（リン脂質など）などを混合、加熱して溶液とした後に、必要量の水を加え、乳化機（ホモジナイザー、例えば高圧噴射型や超音波型など）を用いて、乳化・均質化处理して行い得る。また、これを凍結乾燥することも可能である。なお、脂肪乳剤化するとき、乳化助剤を添加してもよく

、乳化助剤としては、例えばグリセリンや糖類（例えばブドウ糖、ソルビトール、果糖など）が例示される。

【0050】

シクロデキストリン包接化は、例えば当該物質を溶媒（エタノールなど）に溶解した溶液に、シクロデキストリンを水などに加温溶解した溶液を加えた後、冷却して析出した沈殿をろ過し、滅菌乾燥することにより行い得る。このとき、使用されるシクロデキストリンは、当該物質の大きさに応じて、空隙直径の異なるシクロデキストリン（ α 、 β 、 γ 型）を適宜選択すればよい。

【0051】

本発明に係わるペプチドおよび上記同定方法で得られた化合物は、試薬として利用できる。例えば HNF-4 α が関与する転写因子ネットワークについての研究および HNF-4 α の機能不全や分解に起因する疾患、例えば糖尿病における HNF-4 α やカルパインの関与についての分子レベルでの研究などに有用である。

【0052】

さらに本発明は、カルパイン、カルパインをコードするポリヌクレオチド、カルパインをコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つと、HNF-4 α 、HNF-4 α をコードするポリヌクレオチドおよびHNF-4 α をコードするポリヌクレオチドを含有するベクターのうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットを提供する。当該試薬キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。

【0053】

上記試薬キットは、カルパインとHNF-4 α の分解を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、バッファー、並びに塩など、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤などの物質を含んでもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

【0054】

【実施例】

以下に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

【0055】

【実施例 1】

(m-カルパインと相互作用する蛋白質のインシリコでの探索)

m-カルパインと相互作用する蛋白質を、国際公開第WO01/67299号公報記載の予測方法に従って予測した。まず、m-カルパインのアミノ酸配列がある長さのペプチドに分解し、各ペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索した。ついで、得られた蛋白質とm-カルパインとの間でローカルアライメントを行い、ローカルアライメントのスコアの高いものをm-カルパインと相互作用すると予測した。

【0056】

解析の結果、m-カルパイン由来の6アミノ酸残基からなるペプチドFKLP PG (配列番号3) と相同性のあるペプチドYKLLPG (配列番号4) が、肝遺伝子の発現を制御することが知られている核転写因子の一つであるHNF-4 α のアミノ酸配列中に存在することが分かった(図2)。図2Aはヒトm-カルパインとヒトHNF-4 α とのローカルアライメントの結果を、図2Bはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 α とのものを示す。ここにおいて、アミノ酸配列は1文字表記するものである。この結果から、HNF-4 α はm-カルパインと相互作用する蛋白質であると予測された。なお、ウサギm-カルパインについてNCBIデータベースに登録された配列情報には、ヒトm-カルパインの279番目のアミノ酸残基以降の配列に相当する領域しか記載がないが、この領域での同一性は94%であることから、278番目以前のアミノ酸配列についてもウサギm-カルパインはヒトm-カルパインとほぼ同等と考えられる。

【0057】

【実施例 2】

(ウサギm-カルパインによるヒトHNF-4 α の分解)

m-カルパインがシステインプロテアーゼであることから、HNF-4 α のm

ーカルパインによる分解を、ウサギmーカルパインを用いたインビトロ分解試験で検討した。

【0058】

<材料>

HNF-4 α 発現プラスミドを以下のように構築した。まず、ヒトHNF-4 α cDNAを、ヒト脳polyA⁺ RNAから逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)により獲得した。PCRエラーと思われる塩基置換はQuick Change Site-Directed Mutagenesis kit (STARATAGENE社)により修正した。その後、N末端にヒスチジンタグ(His-tag)およびXpress-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミドp cDNA3.1/His (Invitrogen社)にEcoRIサイトで組込み、HNF-4 α 発現プラスミドを構築した。クローニングしたHNF-4 α cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号XP_009514 (登録遺伝子名はHNF4A。)と同一であった。

【0059】

HNF-4 α 発現プラスミドを用い、インビトロでのHNF-4 α 蛋白質の合成を、TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega社)を使用して行なった。すなわち、HNF-4 α 発現プラスミドとTNT T7 Quick Master Mixを混合し、メチオニン存在下で30℃にて1.5時間インキュベーションしてHNF-4 α を合成した。

【0060】

<方法>

インビトロにおける蛋白質分解試験は、合成したHNF-4 α にウサギの筋肉より抽出したmーカルパイン(PROTEASE, Calcium Activated Neutral, calpain, Sigma社)を最終濃度50 μ g/mLとなるように添加し、200mM Tris-HCl (pH7.8) / 1mM ジチオスレイトール(DTT) / 6mM CaCl₂存在下で37℃に

て1時間インキュベーションすることにより行なった。また、カルシウム非存在下での分解試験を行なうために、6mM CaCl_2 の代わりに10mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を添加した試料を作製して同様にインキュベーションした。インキュベーション後の試料は、等容量の2×ドデシル硫酸ナトリウム(SDS) サンプルバッファー〔4% SDS/125mM Tris-HCl, pH6.8/20% グリセロール/0.01% ブロムフェノールブルー(BPB)/10% β -メルカプトエタノール(mercaptoethanol)〕を加えて5分間加熱し、10% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗HNF-4 α 抗体/C-19(Santa Cruz Biotechnology社)および抗Xpress抗体(Invitrogen社)を用いてウェスタンブロッティング法によりHNF-4 α を検出した。検出はECL western blotting detection kit(Amersham Pharmacia Biotech社)を使用して行なった。

【0061】

<結果>

図3Aおよび図3Bに示したように、ウサギm-カルパインによるHNF-4 α の分解が認められた。一方、HNF-4 α はカルシウム非存在下またはm-カルパイン無添加では分解されなかった。ウサギm-カルパインとヒトm-カルパインは約94%の高い相同性を有することから、ヒトm-カルパインも同様にHNF-4 α を分解すると考えられる。以上の結果から、HNF-4 α はm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

【0062】

【実施例3】

(ヒトm-カルパインとヒトHNF-4 α の結合解析)

m-カルパインとHNF-4 α の結合を、細胞内共発現/免疫沈降法による結合試験により検討した。

【0063】

<材料>

m-カルパイン発現プラスミドの構築は以下のように行なった。まず、カルパ

イン cDNAを、ヒト肝polyA⁺ RNA (Clontech社) からRT-PCRにより獲得した。PCRエラーと思われる塩基置換はQuickChange Site-Directed Mutagenesis kit (STARATAGENE社) により修正した。その後、C末端にFLAG-tagを付加させる動物細胞用発現プラスミド、pCMV-Tag4 (STARATAGENE社) へSal-Iサイトで組込み、m-カルpain発現プラスミドを構築した。クローニングしたm-カルpain cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号AAA35645 (登録遺伝子名はCAPN2。) と、73番目および74番目のアミノ酸がメチオニン-アルギニン (MR) からイソロイシン-グルタミン酸 (IE) に置換されている以外は同一であった。このIEへの置換はSwiss-Prot (P17655) においてコンフリクト (Conflict) の記載がある。

ヒトHNF-4 α 発現プラスミドは、実施例2で調製したものをを用いた。

【0064】

<方法>

まず、m-カルpain遺伝子とHNF-4 α 遺伝子をHEK293T細胞に共遺伝子導入した。具体的には、細胞数 1.3×10^6 のHEK293T細胞を37℃にて5%CO₂の存在下で4時間培養した後 (直径60mm シャーレ)、5 μ gのHNF-4 α 発現プラスミドまたは陰性対照としてpcDNA3.1/Hisプラスミドを5 μ gのm-カルpain発現プラスミドと共に、FuGENE6 Transfection Reagent (Roche社) を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (-) [以下、PBS (-) と称する。] で細胞を洗浄し、500 μ lの細胞溶解バッファー [20mM HEPES, pH7.5 / 150mM NaCl / 1mM EDTA / 1% Triton X-100 / 1mM フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF)] に懸濁し、氷上で20分間放置した。その後、4℃にて15,000rpmで20分間遠心処理して、その上清を回収して細胞ライセート (cell lysate) とした。次に、採取したライセートに、0.1%の牛血清アルブミンを含むTBS (pH8.0) で前処理したProtein

G Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech社) を18 μ l 添加し、4℃にて2時間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に抗HNF-4 α 抗体/c-19を0.6 μ g 添加し、4℃で1時間転倒混和后、Protein G Sepharose 4 Fast Flowを20 μ l 加え、さらに4℃で1時間転倒混和した。その後、遠心処理によりProtein G Sepharoseを回収し、500 μ l の洗浄バッファー〔50mM Tris-HCl, pH7.5/150mM NaCl/0.2% ノニデットP-40 (Nonidet P-40)〕で3回洗浄した後、30 μ l の2×SDS サンプルバッファーを加えて5分間加熱後、上清を10% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗FLAG M2抗体 (Sigma社) および抗Xpress抗体を用いてウェスタンブロッティング法により結合した蛋白質を検出した。検出はECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech社) を使用して行なった。

【0065】

<結果>

図4Aに示したように、抗HNF-4 α 抗体による免疫沈降 (図中IPと表示) において、m-カルパイン (FLAG-tag付加) は、HNF-4 α (Xpress-tag付加) と共発現させた試料 (図中レーン1) でのみ共沈した。HNF-4 α 非発現細胞ではm-カルパインの共沈降は認められなかった。このことから、この共沈降はアガロースビーズへの非特異的結合によるものではなく、HNF-4 α とm-カルパインの結合を示すものであることが明らかになった。両試料におけるm-カルパインの発現が同程度であることは、抗FLAG M2抗体によるウェスタンブロッティングの結果により確認した (図4Aのlysa te参照)。また、細胞内のXpress-HNF-4 α が抗HNF-4 α 抗体により回収されることは、図4Bに示した結果から確認できた。

【0066】

【実施例4】

(ヒトm-カルパインによるHNF-4 α の分解)

ヒトm-カルパインによるヒトHNF-4 α の分解について検討するために、ヒトm-カルパイン発現昆虫細胞ライセートを用いてインビトロ分解試験を実施した。

【0067】

<材料>

ヒトHNF-4 α は、HNF-4 α 発現プラスミド（実施例2参照）を用いて実施例2と同様の方法で作製したものをを用いた。

ヒトm-カルパインは、昆虫細胞で発現させたものをを用いた。まず、ヒトm-カルパイン cDNAを実施例3と同様に調製した。また、カルパインスモールサブユニット1 cDNA (calpain small subunit 1 cDNA) をヒト骨格筋cDNA (Clontech社) からPCRにより獲得し、シーケンスにより配列を確認した。カルパインスモールサブユニット1 cDNAのアミノ酸翻訳配列は、NCBIデータベースのアクセッション番号NP_001740 (登録遺伝子名はCAPNS1。) と同一であった。蛋白質発現はバキュロウィルスを用いた昆虫細胞 (夜盗蛾sf-9細胞) 発現系にて行なった。すなわち、各々のcDNAをpFastBac DUALプラスミド (Invitrogen社) に組み込み、Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems (Invitrogen社) を用いて、sf-9細胞にm-カルパインおよびカルパインスモールサブユニット1を共発現させた。これら蛋白質を発現させたsf-9細胞は、冷却したPBSで洗浄後、凍結融解により破碎した。ついで、20mM Tris-HCl (pH 7.5) / 5mM EDTA / 10mM β -メルカプトエタノールを添加し、氷中で超音波処理した後に遠心処理 (15,000rpm \times 30分間) し、その上清を活性体試料 (細胞ライセートと称する。) とした。また、蛋白質非発現sf-9細胞のライセートを同様に調製し、陰性対照として使用した。ライセートのm-カルパイン活性の有無は、基質としてカゼインを用いて確認した (非特許文献35)。また、陽性対照としてラットm-カルパイン (Calpain 2, 大腸菌を用いて発現させたラット組換え体, Calbiochem社) を用

いた。

【0068】

<方法>

インビトロ蛋白質分解試験は、HNF-4 α にm-カルパイン、ラットm-カルパインまたはカルパイン非発現sf-9細胞ライセートを添加し、200mM Tris-HCl (pH 7.8) / 1mM DTT / 6mM CaCl₂存在下で37℃にて1時間インキュベーションすることにより行なった。ヒトm-カルパインの反応系での最終濃度は、蛋白質を発現させたsf-9細胞ライセートの蛋白質濃度で2.33mg/mLとした。ラットm-カルパインの反応系での最終濃度は59unit/mLとした。さらに、カルパイン無添加の条件下で、上記同様に分解試験を行なった。また、カルシウム非存在下条件として6mM CaCl₂の代わりに10mM EDTAを添加した試料を作成し、該試料について同様に分解試験を行なった。インキュベーション後の試料は、等容量の2×SDS サンプルバッファーを加え5分間加熱し、5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗HNF-4 α 抗体/C-19 (Santa Cruz社)を用いたウェスタンブロッティングによりHNF-4 α を検出した。検出はECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech社)を使用した。

【0069】

<結果>

図5に示すように、ヒトm-カルパインによるヒトHNF-4 α の分解が認められた。一方、カルシウム非存在下、非発現sf-9細胞ライセートおよびカルパイン無添加ではいずれもHNF-4 α の分解が認められなかった。これらから、HNF-4 α はヒトm-カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが明らかになった。

【0070】

【実施例5】

(ヒト μ -カルパインによるHNF-4 α の分解)

ヒト μ -カルパインによるヒトHNF-4 α の分解試験を、ヒト μ -カルパイ

ンを用いてインビトロで実施した。

【0071】

<材料>

HNF-4 α 蛋白質は、実施例2と同様の方法で、HNF-4 α 発現プラスミド（実施例2参照）を用いて調製したものをを用いた。

μ -カルパインは、ヒト赤血球より抽出したもの（Calpain 1, ヒト erythrocytes, Calbiochem社）を用いた。

【0072】

<方法>

インビトロ蛋白質分解試験は、HNF-4 α に μ -カルパインを最終濃度 50 unit/mL となるように添加し、200mM Tris-HCl (pH 7.8) / 1mM DTT / 6mM CaCl_2 存在下で 37℃ にて 1 時間インキュベーションすることにより行なった。対照実験としてウサギ μ -カルパイン（実施例2参照）を最終蛋白質濃度 50 $\mu\text{g/mL}$ 、またはラット μ -カルパイン（実施例4参照）を最終濃度 59 unit/mL となるように添加し、上記同様の条件下でインキュベーションした。また、カルシウム非存在下条件として 6mM

CaCl_2 の代わりに 10mM EDTA を添加した試料を作成し、該試料について同様に分解試験を行なった。インキュベーション後の試料は、等容量の 2×SDS サンプルバッファーを加え 5 分間加熱し、5-20% SDS-PAGE により分離した。HNF-4 α の検出は、実施例4と同様の方法で行なった。

【0073】

<結果>

図6に示したように、ヒト μ -カルパインによる HNF-4 α の分解が認められた。一方、HNF-4 α はカルシウム非存在下試料および μ -カルパイン無添加試料では分解は認められなかった。これらから、HNF-4 α は μ -カルパインによりカルシウム存在下で分解されることが判明した。

【0074】

【実施例6】

(イオノフォア添加によるヒトHNF-4 α の分解)

細胞内におけるHNF-4 α のカルパインによる分解を検討するため、カルシウムイオノフォア添加によるHNF-4 α 分解試験を実施した。

【0075】

<方法>

細胞数 0.7×10^6 のHEK293T細胞を37℃にて5%CO₂存在下で22時間培養した後(直径60mmシャーレ)、2 μ gのHNF-4 α 発現プラスミド(実施例2参照)をFuGENE6 Transfection Reagent (Roche社)を用いてトランスフェクトした。2日間培養後、イオノフォア A23187 (4-bromo-calcium ionophore A23187, Sigma社)を10 μ g/mL添加した培地と交換し、3時間培養した。陰性対照群はイオノフォアの代わりにジメチルスルホキシド(DMSO)を添加した培地と交換した。所定時間培養後、細胞を冷却したPBS(-)で洗浄し、300 μ lの細胞溶解バッファー(10mM HEPES, pH7.5/10mM MgCl₂/42mM KCl/1mM PMSF)に懸濁した後、氷上で20分間放置した。細胞をホモジナイザーで破碎後、4℃にて600gで10分間遠心処理し、その上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。核画分はさらに2 \times PBS/1% Nonidet P-40/0.1% SDSからなる溶液に懸濁し、超音波処理にて破碎した。等量の2 \times SDSサンプルバッファーを加え、5分間加熱後、その上清を5-20% SDS-PAGEにより分離した。HNF-4 α の検出は、実施例4と同様の方法で行なった。

【0076】

<結果>

図7Aおよび図7Bに示したように、イオノフォア添加によりHNF-4 α の分解が認められた。このことから、HNF-4 α は、細胞内においてカルシウム濃度の上昇に伴い、カルシウム依存性システインプロテアーゼであるカルパインによって分解されたと考えられる。

【0077】

【発明の効果】

本発明においては、 m -カルパインと相互作用する蛋白質 HNF-4 α を見出し、その相互作用において m -カルパインが HNF-4 α に結合し、HNF-4 α を切断し分解することを初めて明らかにした。また、 μ -カルパインも同様に HNF-4 α を分解することを見出した。HNF-4 α は転写因子であり、種々の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサーに結合し、当該遺伝子の転写を活性化する。HNF-4 α が、インシュリンなどの糖代謝関連因子の発現に関与していること、および遺伝性 2 型糖尿病の原因遺伝子であることが知られていることなどから、HNF-4 α の減少や機能欠損が糖尿病に関与すると考えられる。したがって、本発明において提供する HNF-4 α 分解阻害剤および／または HNF-4 α 分解阻害方法により、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の産生促進、例えばインシュリン遺伝子のインシュリンの産生促進が可能になる。また、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物の減少に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。具体的には、例えばインシュリンの減少に起因する疾患、より具体的には糖尿病などの防止および／または治療が可能である。このように本発明は、HNF-4 α の過剰な分解に起因する疾患の防止および／または治療のために非常に有用である。

【0078】**【配列表フリーテキスト】**

配列番号 2：ヒト m -カルパインまたはウサギ m -カルパインとヒト HNF-4 α (配列番号 1) のローカルアライメントにおいて高いスコアを示す、ヒト m -カルパインまたはウサギ m -カルパインの部分ペプチド。

配列番号 3：ヒト m -カルパインまたはウサギ m -カルパインとヒト HNF-4 α (配列番号 1) のローカルアライメントにおいて高いスコアを示す、ヒト HNF-4 α (配列番号 1) の部分ペプチド。

【 0 0 7 9 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.

CELESTAR LEXICO-SCIENCES, INC.

<120> A system and method of degradation of hepatocyte nuclear factor 4
alpha, and a method and agent for inhibiting the degradation of the same

<130> NP03-1020

<150> JP P2002-254973

<151> 2002-08-30

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Met Ala Asp Tyr Ser Ala Ala Leu Asp Pro Ala Tyr Thr Thr

1

5

10

15

Leu Glu Phe Glu Asn Val Gln Val Leu Thr Met Gly Asn Asp Thr Ser
20 25 30

Pro Ser Glu Gly Thr Asn Leu Asn Ala Pro Asn Ser Leu Gly Val Ser
35 40 45

Ala Leu Cys Ala Ile Cys Gly Asp Arg Ala Thr Gly Lys His Tyr Gly
50 55 60

Ala Ser Ser Cys Asp Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Val Arg
65 70 75 80

Lys Asn His Met Tyr Ser Cys Arg Phe Ser Arg Gln Cys Val Val Asp
85 90 95

Lys Asp Lys Arg Asn Gln Cys Arg Tyr Cys Arg Leu Lys Lys Cys Phe
100 105 110

Arg Ala Gly Met Lys Lys Glu Ala Val Gln Asn Glu Arg Asp Arg Ile
115 120 125

Ser Thr Arg Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Leu Pro Ser Ile Asn
130 135 140

Ala Leu Leu Gln Ala Glu Val Leu Ser Arg Gln Ile Thr Ser Pro Val
145 150 155 160

Ser Gly Ile Asn Gly Asp Ile Arg Ala Lys Lys Ile Ala Ser Ile Ala
165 170 175

Asp Val Cys Glu Ser Met Lys Glu Gln Leu Leu Val Leu Val Glu Trp
180 185 190

Ala Lys Tyr Ile Pro Ala Phe Cys Glu Leu Pro Leu Asp Asp Gln Val
195 200 205

Ala Leu Leu Arg Ala His Ala Gly Glu His Leu Leu Leu Gly Ala Thr
210 215 220

Lys Arg Ser Met Val Phe Lys Asp Val Leu Leu Leu Gly Asn Asp Tyr
225 230 235 240

Ile Val Pro Arg His Cys Pro Glu Leu Ala Glu Met Ser Arg Val Ser

245

250

255

Ile Arg Ile Leu Asp Glu Leu Val Leu Pro Phe Gln Glu Leu Gln Ile

260

265

270

Asp Asp Asn Glu Tyr Ala Tyr Leu Lys Ala Ile Ile Phe Phe Asp Pro

275

280

285

Asp Ala Lys Gly Leu Ser Asp Pro Gly Lys Ile Lys Arg Leu Arg Ser

290

295

300

Gln Val Gln Val Ser Leu Glu Asp Tyr Ile Asn Asp Arg Gln Tyr Asp

305

310

315

320

Ser Arg Gly Arg Phe Gly Glu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr Leu Gln

325

330

335

Ser Ile Thr Trp Gln Met Ile Glu Gln Ile Gln Phe Ile Lys Leu Phe

340

345

350

Gly Met Ala Lys Ile Asp Asn Leu Leu Gln Glu Met Leu Leu Gly Gly

355

360

365

Ser Pro Ser Asp Ala Pro His Ala His His Pro Leu His Pro His Leu
370 375 380

Met Gln Glu His Met Gly Thr Asn Val Ile Val Ala Asn Thr Met Pro
385 390 395 400

Thr His Leu Ser Asn Gly Gln Met Cys Glu Trp Pro Arg Pro Arg Gly
405 410 415

Gln Ala Ala Thr Pro Glu Thr Pro Gln Pro Ser Pro Pro Gly Gly Ser
420 425 430

Gly Ser Glu Pro Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Ala Val Ala Thr Ile Val
435 440 445

Lys Pro Leu Ser Ala Ile Pro Gln Pro Thr Ile Thr Lys Gln Glu Val
450 455 460

Ile
465

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Partial peptide of human m-calpain or rabbit m-calpain showing high score in the local alignment between human m-calpain or rabbit m-calpain and human HNF-4alpha

<400> 2

Phe Lys Leu Pro Pro Gly

1

5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> Partial peptide of human HNF-4alpha showing high score in the local alignment between human m-calpain or rabbit m-calpain and human HNF-4alpha

<400> 3

Tyr Lys Leu Leu Pro Gly

1

5

【図面の簡単な説明】

【図1】 m-カルパインまたは μ -カルパインによるHNF-4 α （配列番号1）の切断認識部位を示す図である。アミノ酸配列は1文字表記し、切断認識部位は下線で示した。

【図2】 m-カルパインとHNF-4 α の相互作用をインシリコで予測した結果を示す図である。図2Aはヒトm-カルパインとヒトHNF-4 α （配列番号1）とのローカルアライメントの結果、図2Bはウサギm-カルパインとヒトHNF-4 α （配列番号1）とのローカルアライメントの結果を示す。アミノ酸配列は1文字表記した。

【図3】 ウサギm-カルパインがインビトロでヒトHNF-4 α をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。図3Aおよび図3Bはそれぞれ、抗HNF-4 α 抗体および抗Xpress抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。図中の+および-は各組成の有無を示す。矢頭はHNF-4 α のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

【図4】 ヒトm-カルパインとヒトHNF-4 α が細胞内で結合したことを示す図である。レーン1はm-カルパイン（FLAG-tag付加）とHNF-4 α （Xpress-tag付加）を共発現させた細胞試料、レーン2はm-カルパイン（FLAG-tag付加）のみを発現させた細胞試料である。図4Aおよび図4Bはそれぞれ、抗FLAG M2抗体および抗Xpress抗体を用いたウエスタンブロッティング（Blot）の結果を示す。図中、IPは抗HNF-4 α 抗体を用いて免疫沈降を行なったことを、lysateは免疫沈降していない細胞試料を示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカーの分子量である。

【図5】 ヒトm-カルパインがインビトロでヒトHNF-4 α をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。ヒトm-カルパインとカルパインスモールサブユニット1とを共発現させた昆虫細胞のライセートをヒトm-カルパインとして用いた。陰性対照としてカルパイン非発現の昆虫細胞ライセートおよびライセート無添加試料（図中では対照と表示。）を用い、陽性対照としてラットm-カルパインを用いた。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。

図は抗HNF-4 α 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-4 α のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカの分子量である。

【図6】 ヒト μ -カルパインがインビトロでヒトHNF-4 α をカルシウム存在下で分解したことを示す図である。図中の+および-はカルシウムの有無を示している。陽性対照としてウサギm-カルパインおよびラットm-カルパインを用いた。図は抗HNF-4 α 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-4 α のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカの分子量である。

【図7】 イオノフォアの添加により細胞内でHNF-4 α が分解されたことを示す図である。図7Aおよび図7Bはそれぞれ、核画分および細胞質画分におけるHNF-4 α の分解を示す。図は抗HNF-4 α 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果であり、矢頭はHNF-4 α の分解物のバンドを示す。図の左列に記載した数値は分子量マーカの分子量である。

【書類名】

図面

【図 1】

1 MDMADYSAAL DPAYTTLEFE NVQVLTMGND TSPSEGTNLN APNSLGVSAL CAICGDRATG
61 KHYGASSCDG CKGFFRRSVR_KNHMYSCRFS RQCVVDKDKR NQCRYCRLKK CFRAGMKKEA
121 VQNERDRIST RRSSYEDSSL PSINALLQAE VLSRQITSPV SGINGDIRAK KIASIADVCE
181 SMKEQLLVLV EWAKYIPAFG ELPLDDQVAL_LRAHAGEHLL LGATKRSMVF KDVLLLGN DY
241 IVPRHCPELA EMSRV SIRIL DELVL PFQEL QIDNEYAYL KAIIFDPDA KGLSDPGKIK
301 RLRSQVQVSL EDYINDRQYD SRGRFGELLL LLPTLQSITW QMIEQIQFIK LFGMAKIDNL
361 LQEMLLGGSP SDAPHAHHPL HPHLMQE HMG TNVIVANTMP THLSNGQMCE WPRPRGQAAT
421 PETPQSPPG GSGSEPYKLL PGAVATIVKP LSAIPQPTIT KQEVI

【図 2】

A

475 FKLPPG (ヒトm-カルパイン) (配列番号2)

437 YKLLPG (ヒトHNF-4 α) (配列番号3)

KL PG

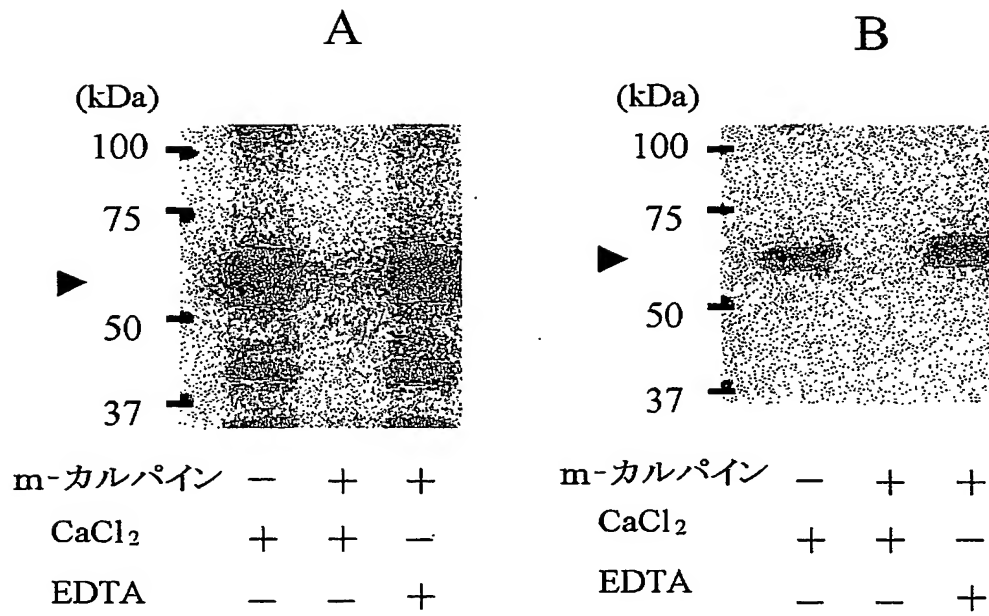
B

197 FKLPPG (ウサギm-カルパイン) (配列番号2)

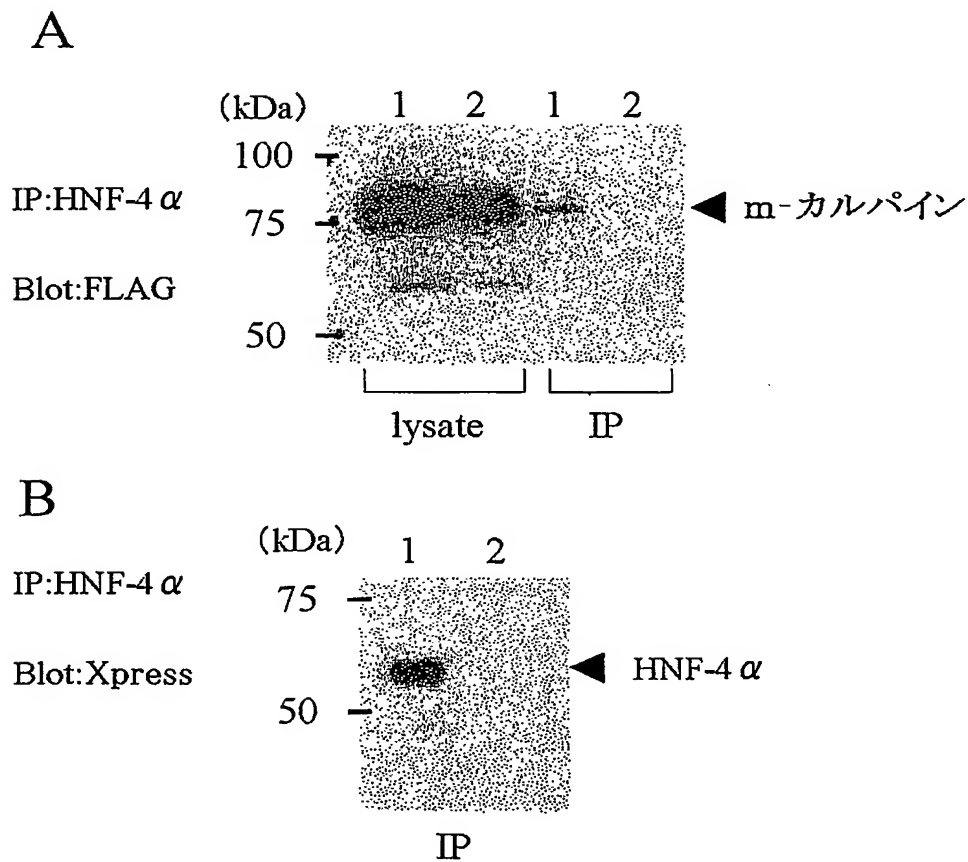
437 YKLLPG (ヒトHNF-4 α) (配列番号3)

KL PG

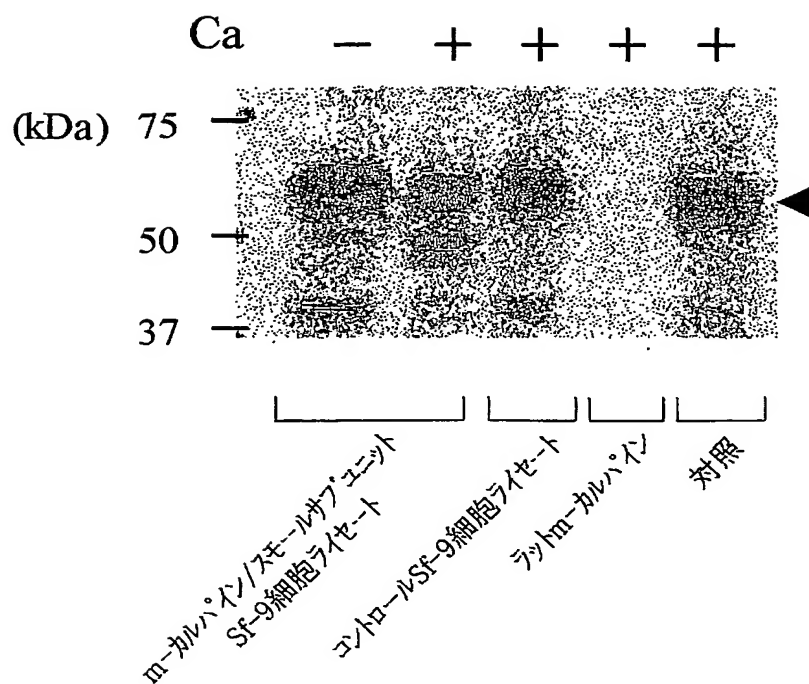
【図 3】



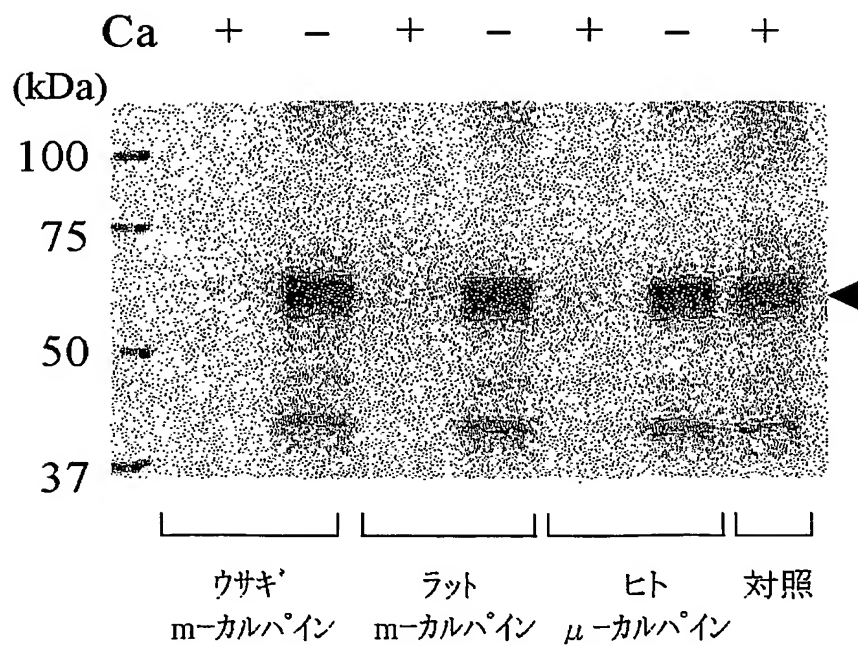
【図 4】



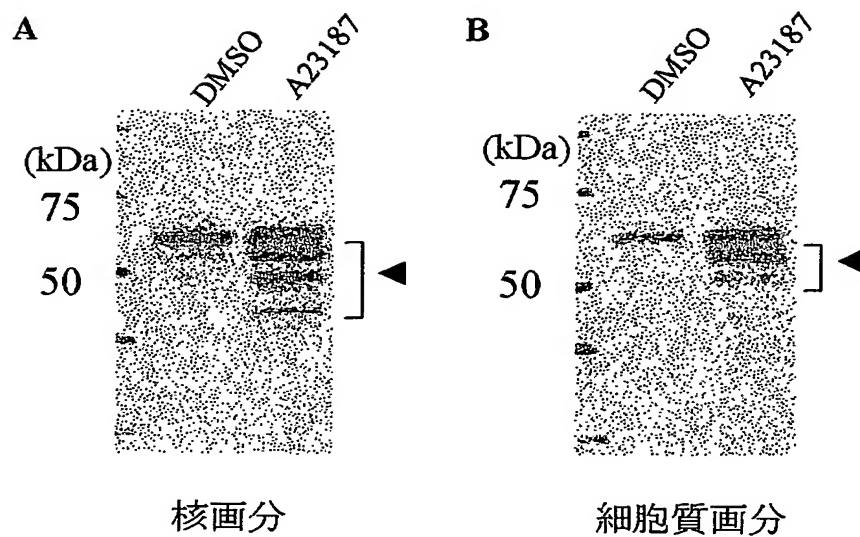
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 カルパインと相互作用する蛋白質を見出し、カルパインによる該蛋白質の分解に起因する疾患の防止手段および／または治療手段を提供する。

【解決手段】 m-または μ -カルパインがヘパトサイトヌクレアーファクター 4 α (HNF-4 α) を分解することを見出したことに基づいて、HNF-4 α の分解方法、HNF-4 α 分解剤、HNF-4 α の分解阻害方法、HNF-4 α 分解阻害剤、HNF-4 α が転写因子として作用する遺伝子の遺伝子産物産生促進剤および産生促進方法、HNF-4 α 分解に起因する疾患の防止剤および／または治療剤並びに防止方法および／または治療方法、カルパインによるHNF-4 α 分解を阻害する化合物の同定方法、該同定方法で得られた化合物、さらにカルパイン、HNF-4 α 、これらをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターを含んでなる試薬キットを提供する。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-096370
受付番号	50300534808
書類名	特許願
担当官	植田 晴穂 6992
作成日	平成15年 7月25日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 3月31日
-------	-------------

特願 2003-096370

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[500520628]

1. 変更年月日

2000年10月26日

[変更理由]

新規登録

住 所

千葉県千葉市美浜区中瀬1丁目3番地 幕張テクノガーデンD
17

氏 名

セレスター・レキシコ・サイエンシズ株式会社

特願 2003-096370

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000002831]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区日本橋3丁目14番10号

氏 名

第一製薬株式会社